14-02

THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix

(Code No. QPS-201, QPS-201T, QPS-201L)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A4196K

ー 目 次 ー

[1] はじめに ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
[2] 製品内容 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
[3] 製品のほかに用意するもの ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
[4] 使用方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
[5] 関連プロトコル: RNA サンプルからの cDNA 合成 ・・13
[6] トラブルシューティング ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14
[7] 関連商品 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

※LightCycler™ は、Idaho Technology Inc.並びに Roche Molecular Systems Inc.の商標です。
※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

[1] はじめに

THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix は、SYBR® Green I 検出系によるリアルタイム PCR のための 2X 濃度のプレミックス試薬です。本試薬は、ROX(別添)とプライマー以外の成分があらかじめ混合されているため、反応液調製が簡便化できるとともに、サンプル間の蛍光強度のばらつきが最小限に抑えられ、再現性の高い結果を得ることができます。

本製品は、従来品＜SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Code No.: QPK-201)および SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- (Code No.: QPK-212)＞の組成を更に改良することで、反応特異性と PCR 効率が向上しています。PCR 効率を上げ、非特異反応(プライマーダイマー等の発生)を抑えることで、幅広い定量可能域(ダイナミックレンジ)を得ることができます。

◆本製品の特長◆

1. 高い特異性 組成最適化により、PCR の特異性が向上しました。非特異反応の低減により低濃度ターゲットの検出における信頼性が向上しています。

2. 様々なターゲットを均一に検出 新規なエンハンサーを採用(特許出願中)。ターゲットごとの PCR 効率のばらつきを最小限に抑えます。

3. 広いレンジで検出可能 高効率、かつ特異的な増幅により、広い測定レンジで解析が可能です。

4. 様々な機器に対応 一般的なブロックタイプの機器のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。また、50X ROX reference dye が別添付されているため、パッシブリファレンスを使用する機器 (Applied Biosystems 社製機器、Agilent Technologies 社製機器など) においても、各機種の特性に応じた最適な ROX 濃度でご使用いただけます。

5. 高速ホットスタート 抗 Taq ポリメラーゼ抗体を用いるホットスタートシステムを採用しています。抗体は加温により速やかに失活するため、最初の変性時間を短時間に設定できます。

＜SYBR® Green I 検出系について＞

SYBR® Green I 検出系では、DNA の増幅を SYBR® Green I の増幅産物への結合による蛍光強度の増大を指標として、検出を行います。

通常の PCR と同様な反応のため簡便ですが、プライマーダイマーや目的以外の増幅産物も検出してしまうため、増幅を行った後に融解曲線解析による確認が必要です。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。

品名および内容	保存	容量 (QPS-201)	容量 (QPS-201L)	容量 (QPS-201T)
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	-20°C (または 2～8°C で 3 か月以内) 遮光保存	5ml (1.67ml x 3)	5ml (5ml x 1)	1ml (1ml x 1)
50X ROX reference dye	-20°C (または 2～8°C) 遮光保存	250µl	250µl	50µl

THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix

反応バッファー、SYBR® Green I、dNTPs、Mg^{2+}、rTaq DNA ポリメラーゼ及び抗 DNA ポリメラーゼ抗体などを含む 2X プレミックス溶液です。鋳型 DNA (cDNA、genomic DNA、plasmid DNA など)とプライマー溶液を添加し、滅菌水で 1X 濃度に調製して使用してください。ROX (passive reference dye)は含まれておりません。

製品到着後は、-20°C で凍結保存してください。初回使用時は、融解させた後、ゆるやかに転倒混和し、溶液を完全に均質化した上でご使用ください。その後は、3 ヶ月以内を目安として、2～8°C で冷蔵保存することができます。長期間使用しない場合は、-20°C で再度凍結保存してください。凍結融解の繰り返しは、10 回程度では品質に影響がないことが確認されています。また、SYBR® Green I の蛍光減衰を防ぐため、保存の際は遮光してください。

50X ROX reference dye

Applied Biosystems 社製機器など、ウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のため、パッシブリファレンスを用いる機器での反応の際に添加してください。最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量については、**[4] 使用方法**の項目をご覧ください。また、パッシブリファレンスによる補正を行わない機器では添加する必要はありません。

-20°C または 2～8°C で遮光保存してください。長期間使用しない場合は、-20°C で凍結保存してください。

※ROX reference dye を同一濃度で定常的にご使用される場合、50X ROX reference dye をあらかじめ THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix へ混合して保存することもできます。混合後はゆるやかに転倒混和し、上記の THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix の保存条件に従って保存してください。混合比率は以下の通りです。ROX 濃度については、**[4] 使用方法**の項目をご覧ください。

ROX を 1X 濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50X ROX = 5ml : 200µl (QPS-201L) 又は 1.67ml : 66.8µl (QPS-201) 又は 1ml : 40µl (QPS-201T)

ROX を 0.1X 濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50X ROX = 5ml : 20µl (QPS-201L) 又は 1.67ml : 6.7µl (QPS-201) 又は 1ml : 4µl (QPS-201T)

[3] 製品のほかに用意するもの

本製品の他に、以下の試薬・機器類をご用意ください。

(1) リアルタイム PCR 装置

本製品は、一般的なブロックタイプ、高速タイプ、ガラスキャピラリータイプなど、各種リアルタイム PCR 装置にご使用いただけます。ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。

(2) プライマー

目的遺伝子配列に対応したプライマーセットをご用意ください。高感度で定量性のあるデータを得るためには、プライマーの設計が重要となります。以下に、設計時の一般的な注意事項を挙げます。

- 長さは20～30mer、GC含量は40～60%に設定します。
- 増幅領域の長さは200bp以下、可能であれば80～150bp程度に設定してください。長すぎると増幅効率が低下しやすくなります。
- 増幅領域は可能であればイントロンをはさんだ領域に設定します。これにより、ゲノムDNA由来の増幅を防ぐことができます。
- プライマーの融解温度(melting temperature: Tm)は、60～65°C程度に設定してください。ただし、融解温度は、計算方法により値が異なりますので、あくまで目安としてお考えください。

また、プライマーの精製純度は、反応特異性に大きな影響を与えます。一般的に精製純度が低いプライマーでは品質のばらつきが大きくなり、非特異反応が発生しやすくなることがあります。可能であればHPLC精製、少なくともカートリッジ(OPC)精製以上の精製グレードのプライマーをご使用ください。

(3) 鋳型 DNA

本製品では、鋳型 DNA として、cDNA、genomic DNA、plasmid DNA、virus DNA など、各種 DNA を用いることができます。

(a) cDNA

一般的な逆転写反応用試薬などを用いて合成した cDNA 液を、精製せずに滅菌水などで適宜希釈して、そのままリアルタイム PCR 反応液に添加してご使用いただくことができます。

添加量は反応液量の 10%を上限の目安としてください。高濃度の添加は、PCR 反応バッファーの組成を大きく変化させ、定量性低下の原因となります。また、リアルタイム PCR での使用が考慮されていない一部の逆転写反応用試薬では、添加可能量は 10%よりも少なくなる場合があります。

※弊社のリアルタイム PCR 用逆転写キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code No.: FSQ-101)は、リアルタイム PCR での反応阻害を低減させる組成を採用しており、反応液中に 20%量まで添加が可能です。

(b) genomic DNA、virus DNA

genomic DNA、virus DNA を鋳型として使用することもできます。SYBR® Green I は全ての 2 本鎖 DNA に結合し蛍光を放つ性質を持つため、多量の 2 本鎖 DNA を鋳型として使用した場合、鋳型 DNA 自身に SYBR® Green I が結合し、ベースラインが大きく上昇することがあります。このため genomic DNA を鋳型として使用する場合、高濃度域での直線性が低下する場合がありますので、添加量にご注意ください(50µl 反応あたり 200ng を上限の目安としてください)。

(c) plasmid DNA

plasmid DNA を鋳型として使用することもできます。ただし、環状のまま使用すると、増幅効率が低下し、正しいコピー数を反映しない場合がありますので、制限酵素で切断し、直鎖状にしたものをご使用ください。

また、精製された plasmid DNA 溶液を鋳型として使用する場合、全 DNA 量に対する標的配列のコピー数が極めて高くなるため、反応液への添加量は少なくする必要があります。その際、溶液中の DNA 濃度が極めて低くなることで、DNA が容器への吸着などによって失われやすくなり、リアルタイム PCR 実施の際に、低濃度域での直線性や再現性が大きく低下する原因となります。希釈の際には、反応と関与しない核酸(yeast RNA など)をキャリアとして希釈液に混合することで、低濃度域の直線性が改善される場合があります。

plasmid DNA のコピー数は、以下の式で簡易的に算出することができます。

$$1\mu g \text{ あたりの plasmid DNA のコピー数} = 9.1 \times 10^{11} / \text{plasmid DNA のサイズ(kb)}$$

[4] 使用方法

(1) 反応液の調製

以下に、50 µl および 20 µl 反応時の調製例を示します。用いるサーマルサイクラーの特性に合わせ、適宜反応液量を増減させてください。

試薬	50µl 反応	20µl 反応	最終濃度
滅菌水	X µl	X µl	
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	25 µl	10 µl	1x
Forward Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 µM*1
Reverse Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 µM*1
50X ROX reference dye	1 / 0.1 µl	0.4 / 0.04µl	1x / 0.1x*2
DNA 溶液	Y µl	Y µl	
合計液量	50 µl	20 µl	

*1: 増幅効率が不十分な場合は、プライマー濃度を増やすことで、また非特異反応が発生する場合は、プライマー濃度を減らすことで、反応結果が改善することがあります。プライマー濃度は、最終濃度 0.2～0.6 µM を目安にご検討ください。

*2: 50X ROX reference dye は、Applied Biosystems 社製機器など、ウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のためにパッシブリファレンスを用いる機器での反応の際に添加してください。最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量は以下の通りです。また、補正を行わない機器では添加する必要はありません。

表 1: 主な機器の最適な ROX reference dye 濃度

機器	最終濃度 (添加量)
Applied Biosystems 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™ など	1X (1/50 量)
Applied Biosystems 7500、7500Fast、Agilent Technologies 社製機器(オプション)など	0.1X (1/500 量)
Roche 社製機器、Bio-Rad 社製機器、BioFlux Line Gene など	不要

※弊社従来品＜SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Code No.: QPK-201)および SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- (Code No.: QPK-212)＞に含まれている ROX は、上記の 1X 濃度に相当します。

(2)PCR サイクル条件設定

以下に、推奨条件(p.3 (2)参照)に基づいて設計されたプライマーを使用する場合の標準的な PCR 温度条件を示します。この 2 ステップ PCR の条件で、ほとんどの標的配列に対応することが可能です。

また本試薬は、多くの場合、既に他の試薬で実施しているサイクル条件をそのまま適用していただくこともできます。

十分な反応効率が得られない場合、または Tm が通常よりも低い(60°C 以下)プライマーを用いる場合は、3 ステップ PCR を実施することで良好な結果が得られる場合があります。詳細は**(2)-3. 反応効率を改善したい場合の 3 ステップ PCR** をご覧ください。

ステップ		温度	時間	昇降速度
初期変性		95°C	20～60 秒*1	最大
PCR (40 cycles)	変性	95°C	1～15 秒*2	最大
	伸長	60°C*3	30～60 秒*4	最大
		(Data Collection は伸長ステップに設定します)		
融解曲線分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)*5				

*1: 本製品では高速ホットスタートシステムを採用しており、極めて短い初期変性時間で酵素が再活性化されます。ただし、鋳型 DNA の変性を完全に行うために、各機器の特性に応じた十分な初期変性時間を設定してください。最適時間がわからない場合は、60 秒に設定してください (初期変性時間の延長は反応効率にはほとんど影響しません)。

表 2: 主な機器における最適な初期変性時間の目安

機器	初期変性時間
Applied Biosystems 社製の高速サイクラー (Applied Biosystems 7500Fast 等)	20 秒
キャピラリータイプの高速サイクラー (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	30 秒
一般的なブロックタイプのサイクラー (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(通常ブロック)、StepOne™、StepOnePlus™、 Agilent Technologies 社製機器、BioFlux Line Gene 等)	60 秒

*2: PCR サイクル中の変性時間は、各機器の特性に応じて、以下の時間に設定してください。不十分な変性時間は、PCR 効率低下の原因となりますのでご注意ください。最適時間がわからない場合は、15 秒に設定してください (変性時間の延長は反応効率にはほとんど影響しません)。

表 3: 主な機器における最適な PCR サイクル中の変性時間の目安

機器	PCR サイクル中の変性時間
Applied Biosystems 社製の高速サイクラー (Applied Biosystems 7500Fast 等)	3 秒
キャピラリータイプの高速サイクラー (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	5 秒
一般的なブロックタイプのサイクラー (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(通常ブロック)、 StepOne™、StepOnePlus™、 Agilent Technologies 社製機器、BioFlux Line Gene 等)	15 秒

*3: 十分な増幅効率が得られない場合は温度を低めに、非特異的反応が発生する場合は温度を高めに設定することで、反応が改善されることがあります。56～64°C の範囲を目安にご検討ください。

*4: 伸長時間は、標的配列が 300bp 以下の場合は 30 秒で十分に反応が進行しますが、一部の機器では、安定した蛍光測定に 30 秒より長い時間を必要とする場合があります。増幅曲線のがたつきや、ウェル間の変動が大きい場合には、長めの時間(45～60 秒)を設定してください。また、機器や制御用ソフトウェアの仕様上、30 秒に設定できない場合もありますので、取扱説明書をご確認の上、設定可能な時間を適宜設定してください(例: Applied Biosystems 7000/7300 では 31 秒以上、7500 では 35 秒以上)。

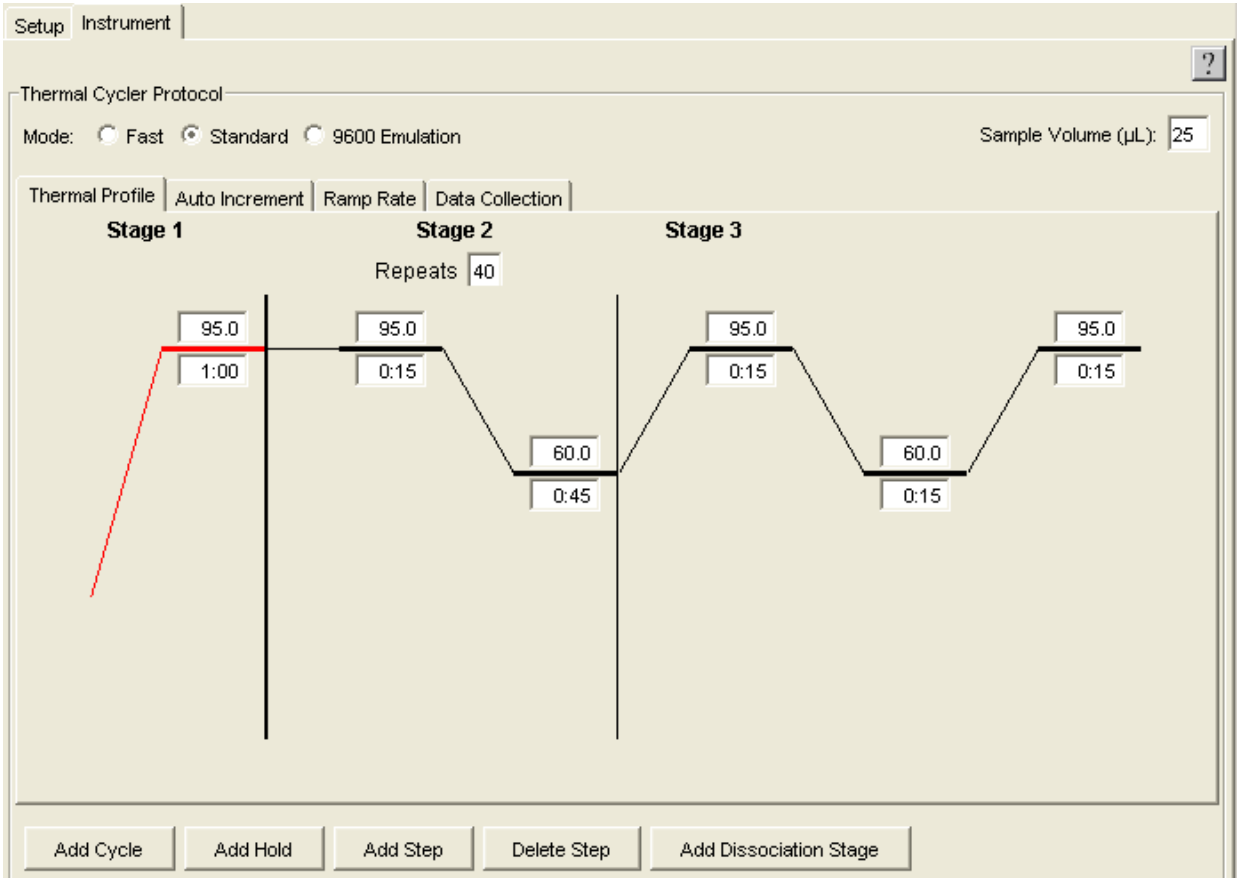
*5: 融解曲線分析の設定は、各機器の標準設定に従ってください。詳しくは、各機器の取扱説明書をご覧ください。

(2)-1 Applied Biosystems 7900HT におけるサイクル条件設定例
(通常ブロックタイプ、ソフトウェアバージョン 2.2.2)

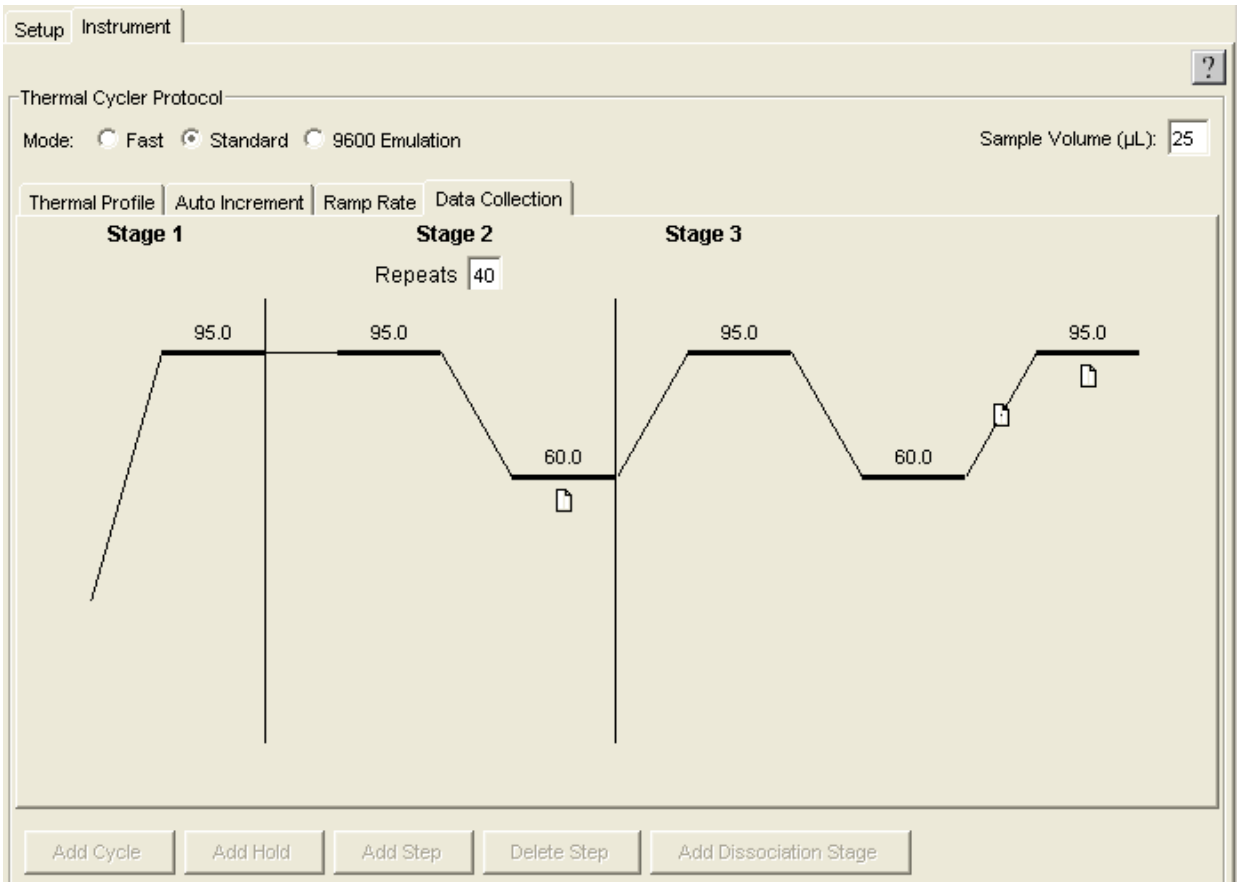
以下に、本試薬を Applied Biosystems 7900HT において用いる場合のサイクル条件設定例を示します。

1. ソフトウェアを起動し、Instrument タブ中の Thermal Profile タブを開き、以下のように温度条件を設定します。融解曲線解析を行う場合は、Add Dissociation Stage ボタンを押してください。融解曲線解析ステージが自動的に追加されます。

※ Sample Volume (µL)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。
※ 伸長時間を 45 秒以下に短縮すると、機器特性の影響により、増幅曲線形状にがたつきが見られる場合があります。



2. Data Collection タブをクリックし、以下の位置のデータ取得をアクティブにします。

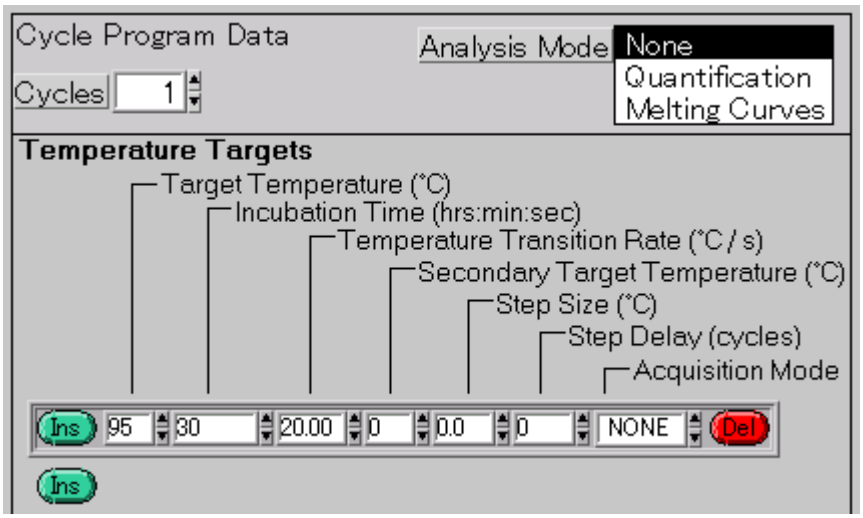


3. 正しい位置にプレートをセットし、プログラムをスタートします。

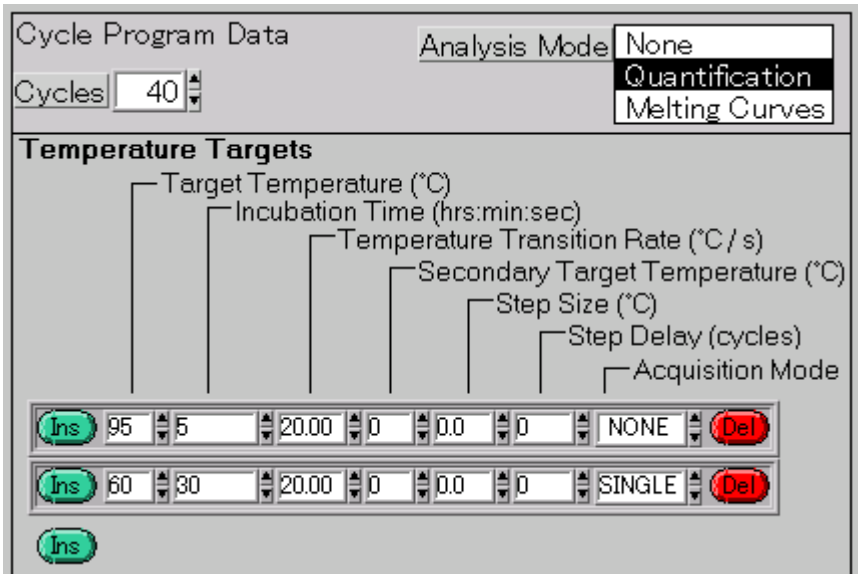
(2)-2 Roche LightCycler 1.1 におけるサイクル条件設定例
(ソフトウェアバージョン 3.5)

以下に、本試薬を Roche LightCycler 1.1 において用いる場合のサイクル条件設定例を示します。

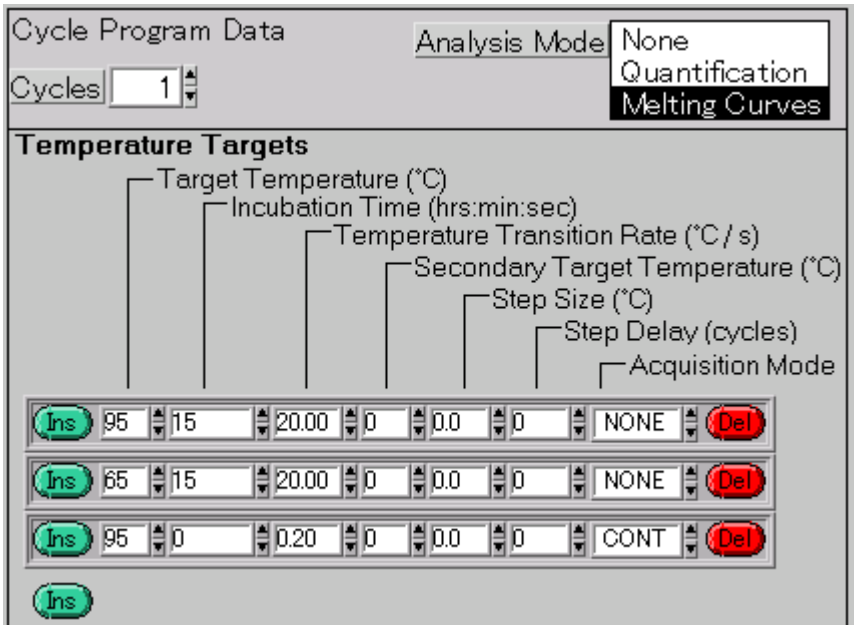
1. ソフトウェアを起動し、各ステージごとに温度条件を入力します。最初の初期変性ステップでは、Analysis Mode は None を選択し、温度および時間は以下のように入力してください。



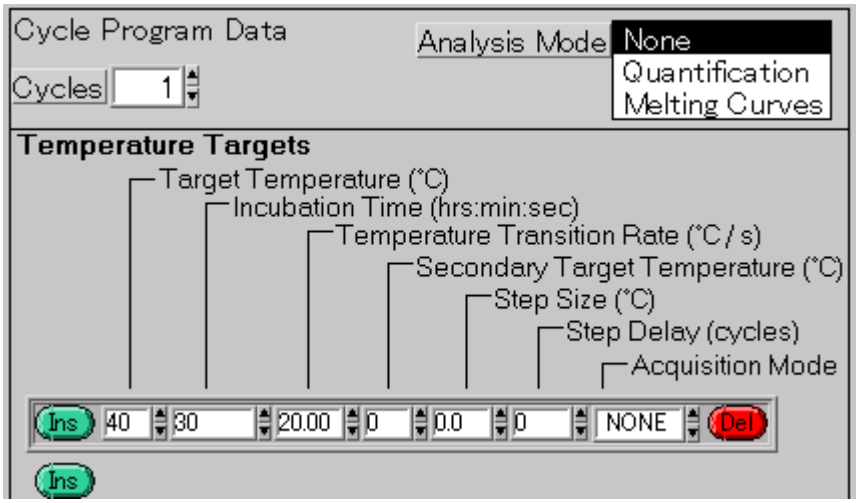
2. 続くPCR ステップでは、Analysis Mode は Quantification を選択し、温度および時間を以下のように入力してください。伸長反応(60°C)の Acquisition Mode は SINGLE に設定します。



3. (融解曲線解析を実施する場合)融解曲線ステップでは、Analysis Mode は Melting Curves を選択し、温度および時間は以下のように入力してください。最終段の 95°C の位置では、Temperature Transition Rate を 0.20 に、Acquisition Mode を CONT に設定します。



4. 反応終了後にチャンバー内を冷却するため、冷却ステップを追加します。Analysis Mode は None を選択し、温度および時間は以下のように入力してください。



5. カローセルにキャピラリーをセットし、プログラムをスタートします。

(2)-3 反応効率を改善したい場合の 3 ステップ PCR

p.6 に記載の 2 ステップ PCR で期待した結果が得られない場合、下記の 3 ステップ PCR を実施することで反応結果が改善されることがあります。特に以下のような場合に改善効果が期待されます。

- プライマーの Tm が通常よりも低い場合 (60°C を下回る場合)。
- 標的配列の鎖長が長い場合 (300bp 以上)。
- その他、PCR 効率が低い場合。

ステップ		温度	時間	昇降速度
初期変性		95°C	20～60 秒*1	最大
PCR (40 cycles)	変性	95°C	1～15 秒*1	最大
	アニーリング	55～65°C*2	5～30 秒*3	最大
	伸長	72°C	30～60 秒*4	
		(Data Collection は伸長ステップに設定します)		
融解曲線分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)*5				

*1: 初期変性および PCR サイクル中の変性条件については、p.6 のガイドラインに従ってください。

*2: アニーリング温度の設定は、プライマーの Tm と同じ温度から Tm-5°C の範囲に設定してください。非特異反応が多い場合は温度を上げることで改善される場合があります。

*3: アニーリング時間は、高速タイプのサイクラーで 5 秒、一般タイプのサイクラーで 15 秒を標準として設定してください。非特異反応が多い場合は短めに、反応効率が悪い場合は 30 秒を上限として長めに設定してください。

*4: 伸長時間は、標的配列が 300bp 以下の場合は 30 秒で十分に反応が進行しますが、一部の機器では、安定した蛍光測定に 30 秒より長い時間を必要とする場合があります。増幅曲線のがたつきや、ウェル間の変動が大きい場合には、長めの時間(45～60 秒)を設定してください。また、機器や制御用ソフトウェアの仕様上、30 秒に設定できない場合もありますので、取扱説明書をご確認の上、設定可能な時間を適宜設定してください(例: Applied Biosystems 7000/7300 では 31 秒以上、7500 では 35 秒以上)。

*5: 融解曲線分析の設定は、各機器の標準設定に従ってください。各機器の取扱説明書をご覧ください。

[5] 関連プロトコル: RNA サンプルからの cDNA 合成

本試薬は、さまざまな逆転写反応用試薬を用いて合成した cDNA を鋳型として用いることが可能ですが、リアルタイム PCR 用に設計された逆転写反応用試薬を用いることで、より感度の高い反応を行うことが可能となります。

弊社の ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code: FSQ-101)はリアルタイム PCR での使用を考慮して設計された、高効率 cDNA 合成キットです。ここでは、ReverTra Ace® qPCR RT Kit を用いたリアルタイム PCR 用 cDNA 合成法について記載します (詳細はキットに添付の取扱説明書をご参照ください)。

(1)RNA の変性

鋳型として用いる RNA 液を使用量分取し、65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷します。

・この処理はスキップすることも可能ですが、この処理を行うことで、高次構造を取りやすい RNA に対する逆転写効率が向上する場合があります。
・この処理を行う際は、5x RT Buffer や酵素液は添加しないでください。RNA の分解や酵素活性の低下の原因となります。

(2)反応液の調製

反応液組成

Nuclease-free Water	X µl
5x RT Buffer	2 µl
RT Enzyme Mix	0.5 µl
Primer Mix	0.5 µl
RNA	0.5pg～1µg
Total volume	10 µl

(3)逆転写反応

37°C で 15 分間インキュベートし、逆転写反応を行います。
↓
98°C で 5 分間インキュベートし、酵素失活反応を行います。
↓
反応終了後、4°C または-20°C で保存します。リアルタイム PCR 実施の際は、鋳型として反応液に直接または希釈して添加してください。

・この温度条件は本キットの組成に最適化された条件となっており、温度条件の変更は、酵素活性以外にも、プライマーのアニーリング効率や、RNA 除去効率、逆転写反応後の酵素失活効率などに大きく影響を与えます。条件の検討を行う際も、必ずこの条件を基本として実施してください。

[6] トラブルシューティング

現象	原因	対策
高濃度サンプルの反応で直線性が乱れる	サンプル DNA への SYBR® Green I の結合によるベースラインの上昇	SYBR® Green I は全ての二本鎖 DNA に結合し、蛍光を発する性質を持つため、サンプルに高濃度の二本鎖 DNA が含まれる場合、ベースラインが上昇し、正確な Ct 値を算出できなくなることがあります。サンプル濃度を下げて反応を行ってください。
	サンプル溶液中の不純物による反応阻害	サンプルの純度が低い場合、不純物によって PCR が阻害されることがあります。また、リアルタイム PCR 用に設計されていない逆転写反応用試薬により合成した cDNA をご使用の場合、逆転写反応液に含まれる物質によって、反応が阻害されることがあります。サンプル濃度を下げて反応を行うか、サンプルの精製を行ってください。また、逆転写反応にはリアルタイム PCR 用に設計された試薬を用いてください。
低濃度サンプルの反応で直線性が乱れる	標的 DNA のコピー数が少なすぎる	反応液中に標的 DNA が数コピーから数十コピーしか含まれない場合、確率的にコピー数のばらつきが大きくなり、直線性が乱れやすくなります。サンプル濃度を上げて反応を行ってください。
	DNA の反応チューブへの吸着	用いたサンプルの DNA 量が少ない場合、またはサンプルを希釈して長時間放置した場合、DNA が反応チューブへ吸着するなどの原因で実質的な鋳型量が減少することがあります。サンプル濃度を上げて反応を行ってください。また、サンプルを希釈して反応を行う場合は、希釈は反応直前に行ってください。
	プライマーダイマーの同時発生	標的 DNA の増幅と、プライマーダイマーの増幅とが同時に発生し、標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。融解曲線分析によって複数のピークが確認される場合は、反応条件の再検討を行い、プライマーダイマーの発生を回避してください。
希釈系列サンプルの増幅曲線の間隔が揃わない	非特異反応との競合	プライマーの特異性が十分でない場合、標的以外の増幅反応が同時発生し、標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。融解曲線分析によって複数のピークが確認される場合は、反応条件の再検討を行い、非特異反応の発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更を検討してください。

現象	原因	対策
PCR 効率が 90%を下回る (slope < -3.6)	反応条件の不適合	標的配列によっては、標準の反応条件で十分な PCR 効率が得られない場合があります。**[4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定**に従って、PCR 反応条件の再検討を行ってください。
	プライマーの Tm が通常よりも低い(60°C 以下)	Tm が低いプライマーを用いた場合、標準のサイクル条件では十分にアニーリングが行われないことがあります。伸長温度を下げるか(p.7、*3 参照)、3 ステップ PCR(p.12 参照)をお試しください。
	プライマーの劣化	プライマーの劣化により、PCR 効率が大きく低下することがあります。プライマーの原液からの再希釈、またはプライマーの再合成を行ってください。
	PCR 効率算出時に、直線から外れた Ct 値を含めた	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れた Ct 値を算出対象から外し、再計算を行ってください。
PCR 効率が 110%を上回る (slope > -3.1)	PCR 効率算出時に、直線から外れた Ct 値を含めた	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れた Ct 値を算出対象から外し、再計算を行ってください。
再現性が良くない	サンプルの純度が低い	サンプルの純度が低いと、PCR への阻害が発生し、再現性が低下することがあります。サンプル濃度を下げて反応を行うか、サンプルの精製を行ってください。
	希釈後、長時間放置したサンプルを使用	濃度が薄い DNA 溶液は、容器への吸着によって実効濃度が低下することがあります。原液から再希釈を行ってください。また、希釈系列による標準サンプルは、希釈後の保存は避け、毎回反応時に原液から都度作製してください。
	鋳型に精製プラスミド DNA や PCR 増幅産物を使用	精製プラスミド DNA 溶液や PCR 増幅産物を鋳型として使用する場合、全 DNA 量に対する標的配列のコピー数が極めて高くなるため、反応液への添加量は少なくする必要があります。その際、溶液中の DNA 濃度が極めて低くなることで、DNA が容器への吸着などによって失われやすくなり、特に低濃度域の直線性や再現性が大きく低下する原因となります。希釈の際には、反応と関与しない核酸(Yeast RNA など)を希釈液に混合することで、低濃度域の直線性が改善される場合があります。
	プライマーの品質差	同一の配列を持つプライマーでも、合成時毎に品質差が発生することがあります。新規に合成を行った際は、従来用いていたものと比較実験を行って、品質差の確認を行ってください。

現象	原因	対策
no-template control (NTC)で増幅が見られる	プライマーダイマーの発生	融解曲線分析において、no-template control のピークが標的配列よりも低温側に存在する場合は、プライマーダイマーの発生が疑われます。プライマーダイマーは、プライマー配列のほか、プライマーの品質によっても発生程度が異なります。まず**[4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定**に従って、PCR 反応条件の再検討を行い、改善が見られない場合には、プライマーの再設計や再合成を検討してください。また、再合成の際は、精製グレードを HPLC 以上にしてください。
	コンタミネーションの発生	融解曲線分析において、no-template control のピークが標的配列とほぼ同じ位置に存在する場合は、反応系へのコンタミネーションが疑われます。再試時も再現する場合には、試薬類や滅菌水へのコンタミネーションが発生している可能性がありますので、試薬類や滅菌水の更新を行ってください。
増幅曲線の蛍光シグナルが弱い、または増幅曲線の形状がギザギザになる	50X ROX reference dye の添加量が過剰	パッシブリファレンスを使用する機器において、50X ROX reference dye の添加量が過剰である場合、蛍光量補正時に SYBR® Green I の蛍光値が低く見積もられることがあります。**[4] 使用方法 (1) 反応液の調製**に従い、50X ROX reference dye の添加量を確認してください。
	蛍光測定時間が短い	一部の機器では、PCR の伸長時間が短すぎる場合、蛍光測定が十分に完了しない場合があります。増幅曲線のがたつきが目立つ場合には、伸長時間を長め(45～60 秒)に設定することで、改善される場合があります。
	反応液量が少ない	機器の標準条件よりも少ない液量で反応を行った場合、蛍光測定値の誤差が増大する傾向があります。液量を増やして反応を行ってください。
融解曲線分析で複数のピークが見られる	非特異反応の発生	プライマーの特異性が十分でない場合、標的以外の増幅反応が同時発生し、純粋な標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。反応条件の再検討を行い、非特異反応の発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更を検討してください。
	プライマーダイマーの発生	標的 DNA の増幅と、プライマーダイマーの増幅とが同時に発生することがあります。反応条件の再検討を行い、プライマーダイマーの発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更や、精製グレードを上げた再合成を検討してください。

[7] 関連商品

各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用リアルタイム PCR 試薬

品名	容量	Code No.
各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用 リアルタイム PCR 試薬 **THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix**	1ml x 1 (40 回用) 1.67ml x 3 (200 回用) 5ml x 1 (200 回用)	QPS-101T QPS-101 QPS-101L

※THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix では、50X ROX reference dye が別容器で添付されます。
※容量は、50µl 反応の場合の反応回数です。
※1000 回用の QPS-101X5 (QPS-101 の 5 セット組) もご用意しています。

cDNA 合成試薬

品名	容量	Code No.
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成キット **ReverTra Ace® qPCR RT Kit**	200 回用	FSQ-101
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成試薬 プレミックスタイプ **ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix**	200 回用	FSQ-201
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成試薬 プレミックスタイプ（ゲノム DNA 除去試薬付き） **ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover**	200 回用	FSQ-301

1 ステップ・リアルタイム PCR 関連試薬

品名	容量	Code No.
各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用 1 ステップ・リアルタイム PCR 用試薬 ***RNA-direct*™ Realtime PCR Master Mix**	0.5ml x 2 (40 回用) 0.5ml x 5 (100 回用)	QRT-101T QRT-101
SYBR® Green I 検出系用 1 ステップ・リアルタイム PCR 用試薬 ***RNA-direct*™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix**	0.5ml x 2 (40 回用) 0.5ml x 5 (100 回用)	QRT-201T QRT-201

※*RNA-direct*™ シリーズでは、50mM $Mn(OAc)_2$ が別容器で添付されます。
※容量は、50µl 反応の場合の反応回数です。
※500 回用の QRT-101X5、QRT-201X5 (QRT-101 または QRT-201 の 5 セット組) もご用意しています。

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください
◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆
http://www.toyobo.co.jp/bio

【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（東京)
〒104-8345　東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号　住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819　FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］http://www.toyobo.co.jp/bio